ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Torino) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Estratto



TORINO
CARLO CLAUSEN

FIRENZE - ERMANNO LOESCHER - ROMA

1897

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE. — Vol. XXII. N. 2.

Laboratorio dell'Istituto Sieroterapico Milanese.

CONTRIBUTO
ALLA
CONOSCENZA DELL'ANTITOSSINA DIFTERICA

DEI DOTTORI

S. BELFANTI e **T. CARBONE**

Fin dal giorno della memorabile scoperta dei sieri antitossici dovuta a Behring e a Kitasato, il problema della natura chimica delle sostanze antitossiche, della possibilità di isolare dal siero il principio attivo completamente purificato dagli altri componenti, si impose come uno dei più interessanti, tanto dal lato teorico, quanto dal lato pratico.

Fra i primi che tentarono questo isolamento troviamo il Tizzoni (1) che, nelle sue ricerche sull'antitossina tetanica, ebbe a constatare la grande attività dei precipitati ottenuti saturando il siero con solfato di magnesia alla temperatura di 30°. Egli non si preoccupò di cercare se la precipitazione dell'antitossico con questo mezzo fosse completa, quantitativa e concluse che l'antitossina tetanica non è una siero-albumina, ma piuttosto una globulina od una sostanza che viene precipitata colle globuline. È facile vedere che con così fatte esperienze non si poteva escludere la possibilità che l'antitossico fosse trascinato, per un'azione puramente meccanica, dal pre-

(1) *Virchow's Festschrift*, III, S. 48.

cipitato globulinico, come avrebbe potuto esserlo da qualsiasi altro precipitato.

Brieger ed Ehrlich (1) scelsero come materiale di ricerca il latte di capre immunizzate contro il tetano. Essi cominciarono ad eliminare la caseina per mezzo del caglio e constatarono che il siero di latte aveva esattamente lo stesso valore antitossico del latte stesso. Studiarono quindi l'azione dei sali come mezzo di precipitare l'antitossico da questo siero di latte e trovarono preferibili fra gli altri il solfato di magnèsia e il solfato d'ammonio; con quest'ultimo ottennero una precipitazione pressochè completa, sciogliendo nel siero circa 27-30 °/₀ di sale; il filtrato conteneva quantità insignificanti di sostanza attiva. Essi non credettero tuttavia che questo comportamento rispetto ai sali, che è quello della globulina contenuta come si sa in piccola quantità nel latte, potesse servire a illuminarci sulla natura dei prodotti antitossici e, a questo proposito si esprimono nel modo seguente: « .....lässt sich daraus « kein Schlus ziehen ob hier wirklische Eiweiskörper vor- « liegen oder nicht, da möglicherweise durch die Fällung « der Eiweiskörper die Antikörper mechanisch mitgerissen « werden ».

Più tardi Brieger unitamente a Kohn (2) modificò leggermente il metodo di isolamento sopra descritto. Scioglie in acqua il precipitato ottenuto dal siero di latte, aggiungendovi 32 °/₀ di solfato ammonico, e riprecipita con acetato basico di piombo, avendo cura che la reazione sia leggermente alcalina; se questa fosse acida precipiterebbe anche l'antitossina. Lava il precipitato con acqua leggermente alcalina, riunisce le acque di lavatura al filtrato e precipita nuovamente con solfato ammonico. Ridiscioglie questo precipitato in acqua, elimina colla filtrazione il solfato di piombo formatosi e finalmente precipita un'ultima volta con solfato di ammonio.

(1) Brieger und Ehrlich, « Beiträge zur Kentniss der Milch immunisirter Thiere » (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd. XII).

(2) « Beiträge zur Concentrirung der gegen Wundstarkrampf schützenden Substanz aus der Milch » (*Z. f. H.*, XV, p. 439).

Questo precipitato asciugato su lastre porose, non lo sottopone più, come nel metodo primitivo, alla dialisi, poichè egli crede di aver osservato che una notevole quantità di antitossico passa attraverso alla carta pergamena, ma ricorre invece ad un nuovo procedimento. Dopo averlo ridotto in polvere fina lo sospende in cloroformio; i sali pesanti si raccolgono sul fondo, mentre le sostanze albuminose coll'antitossina galleggiano e possono essere facilmente separate, quasi prive di solfato ammonico. In tal modo ottenne dei preparati il cui valore era 300 o 400 volte più forte di quello del latte primitivo. Per conseguire una purificazione anche più grande egli sottopose in seguito le soluzioni del suo preparato a tre precipitazioni successive con cloruro sodico, fosfato sodico e solfato d'ammonio e trovò che nel secondo di questi precipitati era contenuta la maggior parte della sostanza attiva. Notiamo subito a questo proposito che, stando a queste ultime reazioni coi sali, nel preparato di Brieger doveva esser contenuta anche la globulina del latte, insieme con quantità non piccole di sieralbumina. Perciò se gli autori citati avevano conseguito lo scopo praticamente importante di preparare un antitossico notevolmente concentrato, poco o nulla avevano ottenuto rispetto alla conoscenza chimica degli antitossici.

Migliori risultati avrebbe ottenuti il Brieger nel suo ultimo lavoro pubblicato nel '96 insieme a Boer (1), lavoro che è il frutto di ricerche veramente estese e minuziose e che dovette costare non poca fatica agli autori. Essi adoprarono come materiale di studio siero antitetanico di capra e siero antidifterico di cavallo e di vacca. In una prima serie di ricerche presero in esame l'azione dei precipitanti meccanici e specialmente dei sali. Dopo aver constatato che, saturando col solfato di magnesia a 30°-37°, si precipitava tutt'al più il 50 °/₀ di antitossina, ottennero invece una precipitazione completa associando il cloruro di sodio al cloruro di potassio a

---

(1) Brieger und Boer, « Ueber antitoxine und toxine » (*Z. f. H.*, XXI, p. 259).

30°-37° per 18-20 ore. Il precipitato è quindi sciolto in acqua e sottoposto alla dialisi in acqua corrente, la quale, come Brieger ora riconosce, non dà luogo a nessuna perdita di antitossina. Volendolo purificare ulteriormente, gli autori ricorsero ad una seconda precipitazione saturando con solfato di magnesia a 37° e dializzando per eliminare i sali. Per tal modo da 10 cm^3 di siero ottennero 0,2 gr. di sostanza secca, nella quale sarebbe contenuta tutta la sostanza attiva.

Persuasi che per mezzo dei sali non sarebbe stato possibile, per quanto si variassero i procedimenti, liberare l'antitossina dalle sostanze albuminose inattive del siero, in una seconda serie di ricerche Brieger e Boer si rivolsero ai composti doppii metallici e, dopo una serie di tentativi, si fermarono sui composti collo zinco. A 10 cm^3 di siero diluito col quintuplo volume d'acqua si aggiungono 20 cm^3 di soluzione di cloruro di zinco all'1 %; dopo breve tempo si filtra il precipitato formatosi. Questo è solubile solo in grandi quantità d'acqua e perciò si può, sino a un certo punto, lavarlo. Lo si scioglie quindi in acqua leggermente alcalina (1 goccia di soda normale in 20 cm^3 d'acqua) e si fa gorgogliare nella soluzione dell'acido carbonico. Si filtra dal precipitato di carbonato di zinco e si ottengono le antitossine nel filtrato. In tal modo da 10 cm^3 di siero antidifterico od antitetanico ottennero 0,1 gr. di una polvere facilmente solubile in acqua e che conteneva quantitativamente l'antitossina, ma anche sostanze albuminose e zucchero.

Da ciò che abbiamo riferito si capisce che il Brieger ritiene senz'altro gli antitossici come qualcosa di completamente diverso dalle sostanze albuminose del siero; col suo ultimo metodo egli crede di averli liberati da una gran parte di tali sostanze e si ripromette di poterli ottenere totalmente esenti da albumine perfezionando il suo ultimo processo fondato sulla proprietà che avrebbero le antitossine di formare coi metalli dei composti doppii dotati di particolari caratteri di solubilità.

Benchè non si riferiscano strettamente al nostro argomento, meritano qui di essere riferiti i risultati di Smirnow (1), che,

avendo precipitato le globuline del siero di cavallo normale, le trovò dotate di un potere antitossico non indifferente rispetto alla tossina difterica, purchè mescolate ad essa prima dell'iniezione. Così 0,1 gr. di una soluzione di globulina all'1 $^0/_0$ neutralizzavano l'azione di una dose di tossina capace di uccidere la cavia in 16-40 ore. Se invece la globulina ed il veleno difterico erano iniettati separatamente, la prima non mostrava nessuna attività. Lo Smirnoff si appoggia su queste esperienze per porre in dubbio la bontà del metodo di Ehrlich per il dosaggio del siero antidifterico, ma tale critica, per ragioni che non è qui il caso di esporre, ci pare priva di serio fondamento.

Appunto per rispondere alle osservazioni dello Smirnow. il Dieudonné (1) riprese in esame le proprietà delle globuline del siero di cavallo normale e del siero antidifterico e venne a risultati molto interessanti. Egli trovò che le globuline normali agiscono sulla tossina difterica in grado assai diverso, secondo che sono precipitate con solfato di magnesia, come aveva fatto Smirnow, o con una corrente d'acido carbonico o finalmente sottoponendo il siero alla dialisi e raccogliendo il precipitato formatosi. Mentre il precipitato ottenuto col solfato di magnesia aveva una notevole attività contro la tossina difterica, i precipitati ottenuti cogli altri due metodi erano molto meno attivi e l'attività era anzi in rapporto inverso colla quantità di albumine contenute nel preparato. Da ciò concluse che la sostanza attiva non ha nulla a che fare colle globuline ma viene trascinata insieme ad esse nell'atto della precipitazione, ora completamente, ora incompletamente, secondo il metodo usato. Gli stessi fatti potè osservare in un siero antitossico di alto valore.

---

(1) Smirnow G., « Note sur la détermination du pouvoir neutralisant du serum antidiphterique » (*Archives des sciences biologiques*, t. IV, IV, 1895, n. 3).

(2) Dieudonné, « Ueber diphteriegift-neutralisirende Wirkung der Serum-globuline » (*Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, Bd. XIII, Hef. II. Citato dal *Central. f. Bakt.*, XXI, p. 369).

Risultati analoghi avrebbero ottenuti Pfeiffer e Proskauer (1) in un lavoro sulla antisostanza del colera, lavoro al quale ci contentiamo di accennare trattandosi in esso di una sostanza che sia per la sua origine, sia pel modo d'azione è talmente diversa dagli antitossici tetanici e difterici da non potersi assolutamente applicare a questi ciò che è stato verificato per quella.

Così basterà un cenno sull'azione antitossica dell'istone osservata da Freund e Grosz (2) e sull'atossogeno isolato da A. I. Kondratjeff (3) dalle capsule surrenali e dalla milza di cavallo normale, trattandosi di sostanze di attività dubbia, non confermata da altri autori o per lo meno assai scarsa.

Da quanto avevamo appreso dalla letteratura, era sorto in noi il sospetto che la sostanza antitossica potesse non appartenere al gruppo delle albumine, ma essere semplicemente trascinata dai precipitati albuminosi ottenuti con diversi metodi; ci appariva anzi probabile che dovesse ripetersi per l'antitossico ciò che è avvenuto per le tossine le quali, ritenute da prima per albuminose, si andarono poi sempre più purificando, finchè Brieger le ottenne completamente esenti da ogni reazione specifica delle albumine.

Perciò le nostre ricerche furono da prima indirizzate a due scopi: cercare anzitutto se fosse possibile con un reagente qualsiasi precipitare le albumine del siero, lasciando in soluzione la sostanza attiva. Dato che ciò non riuscisse, vedere se, modificando profondamente in diversi modi le albumine del siero, la sostanza antitossica mantenesse tutto o parte del suo valore; in tal caso avremmo avuto un indizio, se non

---

(1) R. Pfeiffer und B. Proskauer, « Beiträge zur Kenntniss der spezifisch wirksamen Körper im Blutserum von choleraimmunen Thieren » (*Centralbl. f. Bakteriologie*, XIX, p. 191).

(2) *Centralbl. f. innere Med.*, 1895, n. 38 e 39; 1896, n. 19.

(3) *Centralbl. f. Bakt.* XXI, 407.

una prova, che l'antitossico non ha nulla a che fare con le sostanze albuminose.

Per raggiungere il primo di questi scopi noi abbiamo saggiato in una lunga serie di prove i più comuni precipitanti delle albumine, ricercando poi, con esperienze quantitative sull'animale, quanto di sostanza antitossica esistesse nel precipitato, quanto nel filtrato. Noi non riporteremo qui particolarmente tutte le esperienze fatte che rappresentano il lavoro di alcuni mesi, ma diremo invece che il risultato complessivo fu il seguente:

Dei reagenti saggiati alcuni distruggono completamente l'antitossico, così da non trovarsene più tracce nè nel filtrato nè nel precipitato. Altri non alterano in nessun modo l'attività specifica del siero, e in tal caso, se la precipitazione delle albumine è completa, nel filtrato non si trova nemmanco la più piccola frazione d'unità immunizzante. Se la precipitazione è incompleta tanto il filtrato quanto il precipitato possono contenere sostanza attiva, oppure questa può mancare nell'uno dei due. Ma, cosa importante, l'attività antitossica non manca mai, in maggiore o minor grado, in quei preparati che contengono «globuline» intese nel senso corrente, non si trova invece mai nemmanco in minime tracce, là dove le globuline mancano completamente. Sarebbe troppo tedioso e ci consumerebbe troppo spazio il riprodurre qui i protocolli delle singole esperienze: basterà che accenniamo sommariamente i diversi metodi saggiati, anche nella speranza, forse vana, di risparmiare ad altri la fatica di ripetere tentativi inutili.

Fra i mezzi che dànno colle albumine del siero precipitati insolubili, il calore distrugge nel modo più completo il potere antisettico del siero, qualunque siano le condizioni in cui si fa la coagulazione, purchè, ben inteso, essa sia completa o quasi. Se si sottopone il siero senza nessuna aggiunta all'azione di una temperatura tale che basti a fargli prendere una consistenza gelatinosa e un aspetto opalescente, esso può conservare ancora un discreto valore, ma in tal caso non si può parlare di coagulazione e neppure è possibile una separazione

anche parziale delle albumine. Noi abbiamo provato ad acidificare leggermente il siero, ad aggiungervi proporzioni variabili di diversi sali, di glicerina, a combinare la presenza di sali con una reazione alcalina del siero stesso, ma sempre la coagulazione fatta in tali condizioni ci ha dato precipitati inattivi.

L'azione degli acidi forti dovette essere subito messa fuori causa, sapendo quanto è sensibile l'antitossina a tali reagenti.

Abbiamo invece insistito, con diversi tentativi, servendoci del fenolo che precipita le albumine convertendole in composti perfettamente insolubili nell'acqua, e che altera solo in parte l'attività specifica dei sieri. Neutralizzando esattamente il siero ed aggiungendovi piccole quantità di sali si può riescire ad una precipitazione completa delle albumine col fenolo, ma in tal caso il filtrato, provato tal quale o liberato del fenolo, sembra essere totalmente inattivo; se invece rimangono nel filtrato tracce anche minime di sostanze albuminose precipitabili col solfato di magnesia a saturazione, esso può presentare una certa attività contro il veleno difterico, la quale però si limita generalmente a poche unità immunizzanti.

Sono completamente inattivi i filtrati ottenuti dopo precipitazione totale delle albumine con acido picrico e citrico, con tannino, con acido tricloroacetico. Anche qui abbiamo tentato inutilmente le possibili modificazioni dovute ad aggiunta di sali, di glicerina e a differenze nella reazione del liquido.

Col ferrocianuro di potassa ed acido acetico non è facile ottenere nel siero la precipitazione totale delle sostanze albuminose; per ottenerla è necessario che la quantità percentuale dei sali del siero sia ridotta ad un minimo molto basso, ciò che si può conseguire o colla diluzione o colla dialisi. Se ci si contenta di precipitare direttamente il siero o di diluirlo con soli 3-4 volumi d'acqua distillata, si ottiene un precipitato abbastanza abbondante ed un filtrato discretamente attivo (10-50 °/₀ del valore primitivo del siero), ma è facile persuadersi che esso contiene ancora quantità non indifferenti di sostanze albuminose e specialmente di globuline. Se noi pre-

cipitiamo un liquido saturandolo con solfato di magnesia a 37° e filtriamo, il nuovo filtrato diviene perfettamente inattivo mentre nel precipitato globulinico ridisciolto troviamo tutte le U. I., che esistevano nel liquido primitivo.

Se si tratta invece con ferrocianuro ed acido acetico il siero diluito con 9 volumi di acqua distillata o meglio sottoposto a una dialisi prolungata, si ha una separazione completa delle albumine ed il filtrato non presenta neppure frazioni di U. I.

Finalmente noi abbiamo saggiato una serie di sali metallici, moltiplicando i tentativi nei modi i più diversi, incoraggiati in ciò dai lavori del Brieger, e incominciando appunto dal metodo del Brieger col cloruro di zinco. Ma i risultati furono assai poco soddisfacenti, la quantità di sostanze albuminose che si trova nei precipitati che contengono davvero « quantitativamente » l'antitossico non ci parve minore con questo che con altri metodi. Se il precipitato zincico viene essicato, poi lavato con acqua per esportare la maggior parte degli albuminati di zinco, anche una notevole quantità di antitossico viene a perdersi in questa operazione. Noi comprendiamo bene che, lavorando coi composti metallici, anche la più piccola variazione nella quantità dei sali, nella reazione del liquido, nell'acidità del sale metallico, può condurre ai risultati i più diversi; noi non intendiamo perciò criticare i risultati del Brieger, a fare il che ci manca la competenza e l'esperienza. Vogliamo solo rilevare che, a confessione del Brieger stesso, i suoi preparati più puri contenevano ancora quantità non indifferenti di sostanze albuminose. Certo sarebbe stato desiderabile che sulla qualità e sulla quantità di queste sostanze il Brieger si fosse espresso con maggior chiarezza,

Fra i sali metallici da noi sperimentati merita una menzione particolare il cloruro di platino che, a differenza degli altri, forma colle globuline del siero dei composti completamente insolubili tanto nell'acqua come nelle soluzioni alcaline deboli, ma per quanto si estraggano tali composti con soluzioni di soda all'1 $^0/_{00}$, non si riesce ad ottenerne estratti attivi, quantunque, iniettando alle cavie il composto stesso sospeso in

acqua, sia facile persuadersi che esso conserva un notevole valore antitossico. È uno dei casi più dimostrativi del fatto generale che la sostanza antitossica e le globuline del siero si comportano egualmente rispetto ai più diversi reagenti.

Persuasi che coi mezzi da noi tentati la separazione della sostanza antitossica dalle sostanze albuminose era impossibile, ci siamo rivolti al secondo degli scopi che ci eravamo proposti, a ricercare cioè se fosse possibile trasformare e alterare profondamente le albumine del siero, senza perdita del potere antitossico ed abbiamo provato successivamente: 1° l'azione degli alcali deboli, 2° l'azione degli acidi deboli, 3° la digestione pepsica in presenza d'acido cloridrico, 4° la digestione pepsica in presenza di acido lattico, 5° la digestione tripsica.

In questa serie d'esperienze ci colpì subito un fatto importante, la grande differenza cioè nell'intensità e nella rapidità d'azione secondo che si operava direttamente sopra il siero, oppure sopra siero sottoposto prima alla dialisi o sopra le globuline isolate coi precipitanti salini e private quindi dei sali con una dialisi prolungata. Nel primo caso, ad es., dosi discretamente alte di idrato sodico (0,3-0,5 ‰) o di acido cloridrico (0,5-1 ‰) non dànno origine ad alcali- o ad acidalbumine e non abbassano il valore antitossico del siero, se non dopo un tempo piuttosto lungo. Quando invece l'azione di questi reagenti si esercita in soluzioni povere di sali, è prontissima. Così con HCl 1 ‰ alla temperatura di 37° la globulina pura, esente di sali, in poche ore era trasformata quasi completamente in acidalbumina ed in pari tempo il potere antitossico assai elevato in questa soluzione (150 U. I.) era ridotto a zero.

Quest'azione dei sali è del resto un fatto ben conosciuto e se ne trovano esempi ad ogni pagina nei trattati di chimica fisiologica. Per citarne uno, la sieralbumina, che pure è discretamente sensibile all'azione degli acidi, in soluzione satura di solfato magnesico sopporta fino all'1 % di HCl durante 8 giorni, senza che avvenga la minima formazione di acidalbumina.

Sarebbe inutile e tediosa l'esposizione minuta delle nostre esperienze. Basterà il dire che ogniqualvolta l'azione degli acidi o degli alcali diluiti arrivava a trasformare la maggior parte delle sostanze albuminose, il valore antitossico del preparato scompariva completamente, se invece la trasformazione era parziale, si aveva solo una diminuzione che, per quanto si poteva giudicare senza dosaggi, era all'incirca proporzionale alla quantità di albumina alterata.

Risultati analoghi ottenemmo colla digestione, argomento su cui non vogliamo diffonderci, essendo in corso nel nostro Istituto un lavoro speciale su questo soggetto. Possiamo però affermare con certezza che quando la digestione pepsica o pancreatica era talmente avànzata da aversi la scomparsa completa delle albumine coagulabili col calore, il valore antitossico del liquido era ridotto a zero. La sostanza antitossica non resiste adunque ad una digestione, anche non molto avanzata. Colla digestione pepsica di quantità un poco abbondanti di siero, si otteneva, in breve tempo, un precipitato che, lavato per decantazione, era solubile negli alcali deboli e conteneva fosforo (sostanza di Pekelharing?); saggiato nella cavia esso si dimostrò perfettamente inattivo.

La sostanza antitossica non avrebbe adunque nulla di comune colle nucleo-albumine del siero.

Così noi avevamo visto a traverso una serie faticosa di tentativi, che l'attività antitossica non si scompagna mai dalla presenza di sostanze albuminose e specialmente di globuline, avevamo potuto persuaderci che, eliminate queste coi processi più svariati e meno capaci di produrre alterazioni, il valore antitossico si riduce a zero, avevamo constatato che ogni alterazione, anche non molto profonda (digestione pepsica) delle sostanze albuminose, era seguìta dalla perdita dell'attività antitossica. Era quindi naturale che ci chiedessimo se proprio vi sono ragioni abbastanza forti per potere escludere che l'azione antitossica sia legata alle sostanze albuminose del siero

e in ispecial modo alle globuline. Diciamo subito a questo proposito che non ci fermiamo neppure sulla possibilità che l'antitossico possa essere identico alla comune globulina del siero. Basterebbe a dimostrare falsa questa ipotesi l'osservazione di Behring (1): come potrebbe la globulina, egli dice, rappresentare la sostanza attiva pura, se la stessa quantità del mio siero è molto più attiva che non un peso eguale della globulina secca del Tizzoni? Si dovrebbe ammettere che il siero di cavallo immunizzato possedesse una quantità di globulina molto superiore alla normale. Per quanto la cosa paresse assurda già a priori, pure noi abbiamo voluto, per eliminare ogni dubbio, dosare la globulina in un siero antidifterico di alto valore (180 U. I.) e la trovammo corrispondente alla quantità contenuta nel siero di cavallo normale (2). Ma se l'antitossico non è identico alla globulina normale del siero non potrebbe essere legato in qualche modo ad essa o costituirne una particolare modificazione? Per le ragioni già esposte l'ipotesi non ci appariva tale da doversi escludere senz'altro e noi abbiamo perciò voluto sottoporre ad un attento esame tutte le osservazioni che possono stare pro e contro di essa.

Anzitutto è certo che tutti i sali che servono a precipitare totalmente le globuline del siero precipitano anche, insieme con esse, la sostanza antitossica nella sua totalità. Noi abbiamo provato il solfato di magnesia a saturazione, a 35°, il solfato d'ammonio, aggiungendo al siero un volume eguale di soluzione satura, l'acetato di potassa a saturazione, la saturazione successiva con cloruro di sodio e cloruro di potassio a 37°, la saturazione successiva con cloruro di potassio e nitrato di potassio a 37°. Con tutti questi processi si ottengono precipitati formati esclusivamente o quasi esclusivamente di

---

(1) Behring, « Das tetanum heilserum », Leipzig, pag. 15.

(2) Abbiamo dosato le globuline per pesata diretta e per differenza fra le albumine totali del siero e la siero-albumina precipitata col colore, dopo eliminazione delle globuline. La prima analisi ci diede 5,13 °/₀, la seconda 5,07 °/₀. Secondo le analisi di Hammarsten, la media sarebbe di 4,56 °/₀.

globuline e nei quali, usando le debite precauzioni per evitare le perdite, si ritrovavano esattamente tutte le U. I. che esistevano nel siero trattato; nei filtrati rispettivi non si trovano invece nemmanco frazioni di U. I. Noi non comprendiamo come Brieger abbia potuto affermare che, saturando il siero con $MgSO^4$ a 37° non si otteneva al più che il 50 % di sostanza antitossica.

Noi abbiamo ripetuta la prova non una, ma parecchie volte e con sieri diversi e sempre, purchè le precipitazione fosse fatta in condizioni opportune (temperatura e tempo sufficiente), abbiamo avuto gli stessi risultati.

Appunto perchè la cosa è controversa ci pare utile riportare il protocollo di una di queste esperienze:

Siero Cavallo N. 3. Titolazione col metodo Ehrlich.

Cavia a 140 U. I. nulla.
» » 160 » » nulla.
» » 180 » » edema al 1° giorno, muore in 4 giorni.

20 cm³ di questo siero sono saturati con solfato di magnesia finamente polverizzato, fino a rifiuto, si lascia il liquido, in recipiente chiuso, nel termostato a 37°, durante 24 ore, si filtra a 37°, ciò che richiede circa 3 ore. Si scioglie il precipitato in poca acqua, e si lava replicatamente il filtro; soluzione e acqua di lavatura riunite sono portate a un volume esattamente misurato, di 80 cm³. Se tutta l'attività antitossica del siero fosse passata nel precipitato ottenuto col solfato di magnesia, in 80 cm³ dovrebbero esser contenute 40 U. I.; nel filtrato non se ne dovrebbero trovare neppure traccie. Si provano la soluzione del precipitato ed il filtrato nella cavia, col solito metodo di Ehrlich.

Soluzione del precipitato, 80 cm³:

Cavia a 35 U. I. nulla.
» » 40 » » »

Liquido filtrato, dopo precipitazione globulina con $MgSO^4$;

Cavia a 1 U. I. muore in 24 ore.
» » 0,5 » » muore in 48 ore.

È dunque certo che l'antitossina ha, rispetto ai precipitanti salini, l'identico comportamento delle globuline. Ma qui sorge subito naturale l'obbiezione che si tratti di un fatto puramente meccanico; l'antitossico sarebbe trascinato dalle globuline come potrebbe essere trascinato da qualunque altro precipitato prodottosi nel siero, per l'azione dei sali. Perciò noi abbiamo voluto provare se, producendo nel siero mediante aggiunta di sali, un precipitato diverso, si sarebbero trovate in esso quantitá più o meno grandi di antitossico. E poichè nel siero non esistono sostanze che possano essere precipitate coi sali separatamente dalla globulina, vi abbiamo aggiunto una certa quantitá di saponi ed abbiamo poi saturato con nitrato potassico, che non precipita nessuna delle sostanze albuminose del siero. Il precipitato lavato accuratamente con soluzione satura di nitrato potassico si dimostrò nella cavia completamente privo d'azione. Questa esperienza ha per noi un certo valore dimostrativo, specialmente se consideriamo che quelle sostanze che sogliono essere meccanicamente trascinate dai precipitati formatisi nelle loro soluzioni, non sono trascinate soltanto da un particolare precipitato ma, in grado maggiore o minore, da tutti o da quasi tutti (fermenti).

Ma esclusa l'azione puramente meccanica del precipitato globulinico sulla sostanza antitossica, si potrebbe ancora supporre che questa, pur non avendo nulla a che fare colle globuline, avesse in comune con esse la proprietà, assai diffusa fra le sostanze ad alto peso molecolare, di essere precipitata nelle soluzioni saturate con solfato di magnesia e coi sali sopra ricordati. Noi dovevamo perciò esaminare anzitutto questa ipotesi, ricercando quânto potesse contenere di vero; a questo scopo abbiamo ricorso alla precipitazione frazionata del siero. Se aggiungendo ad esso una quantità di sali insufficiente per la precipitazione totale delle globuline, noi otteniamo un precipitato di peso a, e, con una nuova aggiunta di sale, abbiamo un precipitato il cui peso sia, p. es., $2a$, se l'attività antitossica di questo è esattamente doppia di quella del primo, noi possiamo concludere che questa è legata, non

importa in qual modo, con le globuline. Infatti sarebbe difficile ammettere che l'antitossico, pure essendo del tutto distinto da esse, godesse poi delle identiche proprietà, rispetto all'azione dei sali, al punto da seguire passo a passo la precipitazione delle varie frazioni della globulina. L'esperienza era semplicissima: noi cominciammo ad aggiungere a quantità piuttosto forti di siero (300-500 cm³) un mezzo volume di soluzione satura di solfato ammonico. Il precipitato fu ridisciolto in acqua, se ne prelevò una piccola quantità e si dosò in essa la globulina, precipitandola col calore dopo aver leggermente acidificato. Al filtrato ottenuto dopo la 1ª precipitazione si aggiunse la quantità di soluz. satura di solfato ammonico necessaria per avere la separazione totale delle globuline ($^1/_2$ volume del siero primitivo), si sciolse parimente il precipitato e si dosò la quantità di globulina contenuta nella soluzione. Conoscendo il valore antitossico del siero adoprato e la quantità totale di globuline che esso conteneva (4,5 % in cifra tonda) è facile calcolare il numero di U. I. che dovrebbero essere contenute nelle 2 frazioni, nell'ipotesi che tutto l'antitossico fosse legato alla globulina e che si fosse distribuito nelle due frazioni proporzionatamente alla quantità di globulina di ciascuna di esse. Ecco un esempio di tale esperienza:

Le globuline del siero sono precipitate frazionatamente: la 1ª frazione contiene la globulina precipitata aggiungendo ad 1 vol. di siero $^1/_2$ vol. di soluzione satura di solfato ammonico. La 2ª frazione contiene tutta la rimanente.

La soluzione della 1ª frazione contiene 4,5 % di globulina. La soluzione della 2ª frazione contiene 6,4 % di globulina. Sapendo che il siero primitivo aveva un valore di circa 175 U. I., la 1ª frazione nella ipotesi ora formulata, dovrebbe avere 175 U. I., la 2ª 250 U. I. Alla prova nella cavia (metodo Ehrlich).

Frazione 1ª.

Cavia 150 U. I. nulla.
» 170 » » leggero edema che scompare al 3° giorno.

Frazione 2ª.

Cavia 250 U. I. nulla.
» 270 » » leggero edema.
» 300 » » muore in 24 ore.

Come è facile vedere il rapporto fra quantità di globulina e quantità di antitossico nelle due frazioni è evidente. La prima di esse appare, è vero, un poco più debole, ma dobbiamo qui una volta per tutte dichiarare che, se il metodo Ehrlich è suscettibile di un'approssimazione del 5 %, sono a ciò necessarie tante e così speciali condizioni, particolarmente nella scelta degli animali, che non sempre, anche colla maggior buona volontà, si possono ottenere.

Ma se invece di dividere le globuline in due sole grosse frazioni presso a poco eguali, le frazioniamo in un maggior numero di parti, per poi saggiare il valore antitossico di ciascuna di esse, vediamo che le cose non sono più così semplici come nell'esperienza precedente:

500 di siero sono precipitati con 200 di soluzione satura di solfato ammonico, si raccoglie lo scarso precipitato formatosi, (frazione A); al filtrato si aggiungono altri 200 cm.³ della stessa soluzione, si ottiene un precipitato molto abbondante (frazione B); al nuovo filtrato si aggiungono i rimanenti 100 cm.³ di soluzione satura di solfato ammonico, si ottiene un precipitato scarso (frazione C). Tutti e tre i precipitati vengono ridisciolti e si dosa la globulina in essi contenuta.

La frazione A contiene 2,24 %
» » B » 5,01 %
» » C » 3,20 %

Se ne dosa il valore antitossico:

Frazione A.

Cavia U. I. 15 nulla.
» » » 20 edema.

Frazione B.

Cavia U. I. 200 nulla.
» » » 230 muore in 4 giorni.

Frazione C.

Cavia U. I. 120 nulla.
» » » 130 leggerissima infiltraz., che si riassorbe in 3ª giornata.
» » » 200 muore in 48 ore.

Se ora prendiamo per valore della frazione B 200 U. I., la C, proporzionatamente alla globulina che contiene, dovrebbe avere un valore di circa 128 U. I., e ne possiede infatti almeno 120. La frazione A invece dovrebbe averne circa 90 e non ne ha nemmanco 20.

Risultati analoghi abbiamo ottenuto in parecchie altre esperienze col solfato d'ammonio che ommettiamo per brevità, ed anche in una esperienza in cui ci siamo servito invece del solfato di magnesia e che riferiamo qui appresso.

50 cm.^{3} di siero a circa 130 U. I. sono portati a 100 con aggiunta d'acqua distillata e vi si sciolgono 48 gr. di solfato di magnesia. Si ottiene un precipitato scarso (frazione A). Al filtrato si aggiungono altri 30 gr. di solfato di magnesia e si lascia per 12 ore a 36, si raccoglie il precipitato abbastanza abbondante (frazione B). Al nuovo filtrato si aggiungono altri 60 gr. di solfato di magnesia e si raccoglie il precipitato formatosi a 37° (frazione C). Le soluzioni delle diverse frazioni contengono:

A 1,69 % di globulina
B 3,71 % » »
C 1,46 % » »

La titolazione del valore antitossico ci dà i seguenti risultati:

Frazione A.

Cavia 15 U. I. nulla.
» 30 » » forte edema.
» 45 » » muore.

Frazione B.

Cavia 100 U. I. nulla.
» 120 » » nulla.
» 140 » » edema.
» 150 » » forte edema, guarisce dopo molto tempo.

Frazione C.

Cavia	U. I.	40	nulla.
»	» »	60	nulla.
»	» »	65	edema.
»	» »	80	forte edema, si rimette dopo lungo tempo.

Se prendiamo per base 130 U. I. come valore della frazione B, la frazione C, in rapporto colla globulina che contiene dovrebbe avere 52 U. I. ed infatti ne troviamo 60. La frazione A invece ne dovrebbe contenere 60, mentre ne ha poco più di 15.

È dunque evidente che non tutte le frazioni di globulina hanno il medesimo valore antitossico; mentre nella 2ª e 3ª questo è abbastanza esattamente proporzionale al peso, nella 1ª è molto inferiore a quelle che dovremmo aspettarci, circa $^1/_4$ del valore calcolato.

A tutta prima sembra che questi risultati distruggano completamente il ragionamento sopra esposto, relativo agli stretti rapporti fra globuline e attività antitossica. Ma dobbiamo subito osservare che tale ragionamento era fondato sul presupposto che la globulina precipitabile coi sali fosse un' unica sostanza, ciò che è ben lontano dalla realtà. Nella così detta globulina del siero debbono essere contenute almeno tre sostanze: la globulina preesistente nel plasma e che è di gran lunga la più abbondante, quella che deriva dalla distruzione dei globuli bianchi e la fibrino-globulina, prodotto di scissione del fibrinogeno, che si mette in libertà durante il processo della coagulazione; a queste si aggiunga la sostanza di Pekelharing, che ha un comportamento analogo rispetto alla precipitazione coi sali. Si comprende perciò facilmente come, pur essendo l'azione antitossica legata ad una globulina, non tutti i precipitati globulinici debbano essere egualmente attivi. Basta perciò ammettere che anche una sola delle sostanze formanti il gruppo delle globuline manchi completamente di potere antitossico. Ora noi abbiamo potuto constatare che questa non è soltanto un' ipotesi, ma che realmente vi hanno nel siero

globuline inattive. Noi abbiamo preparato a questo scopo il fibrinogeno del sangue antidifterico, sia col metodo di Hammarsten, sia dal plasma all'ossalato di potassa ed abbiamo potuto constatare che le soluzioni di fibrinogeno, purificato o meno, sono perfettamente inattive contro la tossina difterica, anche mescolandovele in forti proporzioni. Noi crediamo così di aver trovato la ragione della minore attività della prima frazione globulinica; è noto infatti che la fibrino-globulina, come il fibrinogeno, è precipitata da quantità di sali molto minori di quelle occorrenti per precipitare la paraglobulina. Questo prodotto di scomposizione del fibrinogeno è contenuto, è vero, in quantità molto piccole nel siero di sangue, ma anche la nostra globulina inattiva ci risultava, tenuto conto del peso del precipitato e del suo valore antitossico, come una piccola frazione delle globuline totali (10 %). Tuttavia noi non ci saremmo creduti in diritto di affermare il rapporto tra parte delle globuline del siero e l'antitossico, se non avessimo potuto dimostrarlo per un' altra via. Abbiamo visto che la 2ª e 3ª frazione di globuline posseggono valori antitossici presso a poco proporzionali al loro peso; tutta la parte inattiva del precipitato coi sali è dunque stata eliminata per mezzo della 1ª frazione. Ora prendiamo questa 2ª e 3ª frazione, e sottoponiamolo ad una nuova precipitazione frazionata; se l'antitossico è veramente legato a questa globulina dovremo avere una serie di frazioni il cui valore antitossico sarà direttamente proporzionale al peso; se invece, sostanza antitossica e globulina si comportano diversamente rispetto ai sali, poichè nelle esperienze precedenti la 1ª frazione conteneva poca antitossina, anche qui dovremo avere una 1ª frazione che ne contenga, proporzionalmente al peso, meno delle altre.

Vediamo ora in che senso parlano le esperienze:

Esperienza *10 Maggio.*

100 gr. di siero del Cavallo 3 (U. I. 160) sono dializzati per 3 giorni in acqua corrente e per 1 giorno, dopo esatta neutralizza-

zione con acido acetico, in acqua distillata. Si filtra e si precipita il filtrato con un volume eguale di soluz. sat. di solf. amm., si lava il precipitato con soluzione semisatura di solfato ammonico, fino a scomparsa delle albumine coagulabili nella lavatura. Si scioglie il precipitato in 50 cm.³ di acqua distillata e vi si aggiungono 25 cm.³ di soluz. sat. di sol. amm.; si ottiene uno scarso precipitato (frazione A).

Al filtrato si aggiunge la quantità di solfato ammonico necessaria per precipitare la totalità della globulina. Si ridiscioglie questa in 25 cm.³ d'acqua e vi si aggiungono 18 cm.³ di soluzione satura di solfato ammonico. Si ottiene un precipitato: frazione B′. Al filtrato di questo si aggiungono i rimanenti 7 cm.³ e si ottiene un secondo precipitato (frazione B″).

La titolazione della globulina nelle soluzioni fatte colle frazioni A, B′ e B″ ci diede rispettivamente 1,05, 0,658 e 2,77 ‰.

Provate sulla cavia diedero i seguenti risultati:

Frazione A.

Cavia 28 U. I. leggerissima infiltrazione che scompare il 2° giorno.
» 33 » » forte infiltrazione.

Frazione B′.

Cavia 30 U. I. nulla.
» 30 » » leggerissima infiltrazione che scompare prontamente.

Frazione B″.

Cavia 150 U. I. nulla.
» 180 » » edema notevole.

Mentre questa esperienza ci conferma il minor valore antitossico della prima frazione precipitata direttamente dal siero, ci dimostra che, frazionando invece un'altra volta il secondo precipitato, si ottengono una prima e una seconda frazione di valore presso a poco corrispondente al peso della globulina che contengono.

Infatti se ammettiamo il valore di 150 U. I. per B″ troviamo che B′ ne dovrebbe avere 32; ne ha in realtà 30 scarse. A dovrebbe possederne 58, mentre arriva appena a 28.

Esperienza *21 Maggio.*

150 cm.^{3} siero Cavallo 6 (160 U. I.) sono dializzati per 24 ore in acqua corrente, per 12 ore in acqua distillata; si neutralizza con acido acetico, si filtra; ai 180 cm.^{3} di filtrato ottenuto se ne aggiungono 120 di soluz. sat. solf. ammonico e si elimina colla filtrazione l'abbondante precipitato formatosi. Al filtrato si aggiungono i rimanenti 60 cm.^{3} di soluz. satura di solfato ammonico. Si discioglie il precipitato così ottenuto in 50 cm.^{3} di acqua e vi si aggiungono 30 cm.^{3} di soluz. sat. di solf. ammonico. Abbiamo così una prima frazione B′, al filtrato della quale aggiungendo i rimanenti 20 cm.^{3} di soluz. sat. solf. ammonico, otteniamo una seconda frazione B″.

La B′ contiene 6,10 $^0/_0$ di globulina; la B″ 3,74 $^0/_0$.

Frazione B′.

Cavia	220 U. I.	nulla.
»	220 » »	leggerissima infiltrazione che scompare il 4° giorno.
»	260 » »	edema forte, muore in 6ª giornata.

Frazione B″.

Cavia	120 U. I.	nulla.
»	135 » »	leggerissima infiltraz. che scompare il 4° giorno.
»	150 » »	forte edema, morte in 7ª giornata.

Anche qui le due frazioni presentano un valore che corrisponde abbastanza esattamente al loro contenuto di globulina; infatti se B′ ha 220 U. I., B″ ne dovrebbe avere 135. Mentre nell'esperienza precedente era la 1ª frazione che presentava un valore un poco più debole di quello calcolato, qui è invece la 2ª.

Esperienza *23 Aprile.*

In una forte quantità di siero si precipita la globulina per due volte sottoponendola ciascuna volta alla dialisi. A 200 cm.^{3} di tale soluzione si aggiungono 125 cm.^{3} di soluzione satura di solfato am-

monico; si forma un abbondante precipitato che si elimina. Al filtrato si aggiungono i rimanenti 75 cm.³ della stessa soluzione e il precipitato ottenuto viene sottoposto ad un nuovo frazionamento. Dopo averlo sciolto in 50 cm.³ d'acqua si ottiene una prima frazione (A) con 25 cm.³ di soluz. sat. di solf. amm. ed una seconda frazione (B) con gli altri 25 cm.³ La frazione A contiene 11,17 °/₀ di globulina, la B 4,57 °/₀.

Frazione A.

Cavia	U. I.	600	nulla.
»	» »	620	»
»	» »	640	»
»	» »	650	edema.

Frazione B.

Calcolando la precedente a 640 U. I., deve contenerne 260.

Cavia	U. I.	240	nulla.
»	» »	240	leggero edema.
»	» »	250	edema forte; si rimette lentamente.

Anche qui la corrispondenza fra il peso della globulina ed il valore antitossico è abbastanza esatta. La differenza supera di poco il limite dell'errore ammesso da Behring e, se mai, è a vantaggio della 1ª frazione.

Noi crediamo dunque di poter affermare che, rispetto alla precipitazione coi sali ($MgSO^4$, $(NH^4)^2SO^4$), *globulina e sostanza antitossica si mostrano costantemente inseparabili; in altri termini, quando si sia eliminata una piccola quantità di globulina inattiva, nella parte rimanente il potere antitossico è direttamente proporzionale al peso delle singole frazioni precipitate.*

Ma a questo punto sorge una grave difficoltà di cui ci eravamo reso conto già prima di leggere il lavoro del Diedonné.

È noto che per isolare le globuline del siero, oltre ai metodi fondati sulla precipitazione coi sali, ne esistono altri due che furono anzi i primi applicati. Se si diluisce il siero con 9-19 volumi di acqua distillata e vi si fa passare una corrente di acido carbonico, si ottiene un precipitato di globulina. Lo stesso

risultato si avrebbe acidificando leggerissimamente con acido acetico il siero diluito.

Se poi sottoponiamo il siero ad una dialisi prolungata in acqua corrente e quindi in acqua distillata, si forma pure un precipitato di globuline, essendo queste, a quanto ci insegnano i trattati di chimica fisiologica, completamente insolubili nell'acqua. Notiamo però che per quanto si prolunghi la dialisi non si ottiene una buona separazione del precipitato se non si ha cura di neutralizzare esattamente il liquido o meglio di acidificarlo leggerissimamente con acido acetico.

Or bene, tanto il precipitato ottenuto in quest'ultimo modo, quanto quello che si forma colla diluzione e passaggio d'acido carbonico, quando erano accuratamente lavati, ci risultavano privi di attività antitossica. Questa era invece perfettamente conservata nel liquido ottenuto per filtrazione di questi precipitati, liquido nel quale, tenuto conto della diluzione, si trovavano tutte le U. I. che erano contenute nel siero primitivo.

Questo fatto ci si presenta a tutta prima come una grave obbiezione all'ipotesi da noi accettata del rapporto indissolubile fra globulina e potere antitossico. Se la globulina ottenuta con alcuni metodi è attiva mentre quella ottenuta con altri è invece perfettamente inerte, si dovrebbe concludere che fra antitossico e globulina non esiste nessun legame.

Ma, esaminando i fatti più attentamente, vediamo che se il valore di tale obbiezione non è nullo, non è nemmanco tanto grande come appare a prima vista.

Anzitutto dobbiamo dichiarare che nelle nostre esperienze la quantità di globulina ottenuta coi due metodi esposti non è che una piccola frazione della globulina precipitabile con solfato di magnesia. Così in un' esperienza in cui abbiamo diluito il siero con 19 vol. d'acqua ed abbiamo fatto passare una corrente d'acido carbonico, ottenemmo di precipitare soltanto 0,29 di globulina per 100 di siero. Essa formerebbe dunque poco più del 6 % della globulina totale. Aggiungiamo che queste globuline sono straordinariamente impure, poichè sono mescolate a quantità relativamente grandi di sostanze

solubili in alcool-etere e per di più contengono fosforo (nucleo-albumina di Pekelharing?).

Finalmente, e ciò ha per noi la massima importanza, differiscono pei loro caratteri di solubilità dalle globuline precipitate coi sali: sono molto meno solubili nell'acqua salata, difficilmente forniscono soluzioni perfettamente limpide, e, quand'anche si riesca a ottenerle con replicate filtrazioni, esse si intorbidano col tempo, lasciando depositare quantità non piccole di una sostanza che fornisce tutte le reazioni delle albumine. Da tutto ciò nasce il sospetto che si tratti qui o di una particolare globulina o di globuline alterate per l'azione protratta della dialisi e dell'acido carbonico. Noi non abbiamo competenza nè esperienze sufficienti per decidere quale delle due ipotesi sia da preferirsi. Parlerebbe a favore della prima l'osservazione da noi fatta che, se si sottopone il siero a una dialisi prolungata e quindi, eliminato il precipitato formatosi colla neutralizzazione, si precipitano coi sali le globuline rimanenti e le si sottopongono ad una nuova dialisi, non si ottiene più che un precipitato assolutamente insignificante. Una volta eliminata completamente la globulina precitabile colla dialisi, non è più possibile, ripetendo il trattamento, ottenerne dell'altra, ciò che dovrebbe invece avvenire se si trattasse di una modificazione della globulina dovuta al trattamento stesso (1). D'altra parte parlerebbero a favore di quest'ultima ipotesi i fatti noti e già da noi accennati della grande facilità con cui gli alcali e gli acidi trasformano le globuline, nelle soluzioni molto povere di sali. A ciò che abbiamo già detto aggiungeremo qui un'osservazione registrata su tutti i trattati di chimica fisiologica: nella precipitazione delle glo-

(1) Noi sappiamo che chimici competentissimi hanno invece osservato che si può con dialisi successive ottenere sempre nuove precipitazioni di globulina (Hammarsten, *Zeitsch. f. phys. Chem.*, VIII, p. 467). Ma le nostre osservazioni d'altra parte sono talmente nette da non permetterci dubbio: forse i risultati contrarii sono da attribuirsi al fatto che non si usavano, al tempo di quelle ricerche, i dializzatori di Kühne, che permettono una dialisi non solo più rapida, ma più completa, pure evitando le alterazioni dovute ai batterii.

buline con acido carbonico, quando si protrae un po' a lungo l'azione di questo, una parte del precipitato ripassa in soluzione, poi si riprecipita, allorchè si abbandona il liquido all'aria, ma allora il precipitato non è più solubile nell'acqua salata; si è trasformato in acidalbumina (1).

Ma se anche vogliamo ammettere che la globulina precipitata colla dialisi o colla soluzione e CO^2 non si distingua per nulla da quella che si ottiene saturando con solfato di magnesia a 35°, non farà meraviglia che essa abbia perduto il suo valore antitossico, quando si ricordi con quanta facilità questo sia distrutto per l'azione di quantità anche piccolissime di acido, nelle soluzioni quasi completamente prive di sali.

Perciò dinanzi ai risultati nettissimi che abbiamo ottenuto colla precipitazione frazionata, noi non crediamo che i fatti ora discussi siano sufficienti a scuotere il principio da noi affermato che *attività antitossica e globulina del siero siano due cose inseparabilmente legate fra loro*. Di che natura sia poi questo legame, le nostre esperienze non ci permettono di affermare. Due sono le ipotesi possibili: che l'attività antitossica risieda in una sostanza la quale sia unita alla globulina con tali legami, che gli attuali metodi chimici non ci permettano di spezzare, senza distruggere nello stesso tempo il potere antitossico. Oppure che la globulina dell'animale vaccinato subisca particolari modificazioni nella struttura della sua molecola che, pur non modificando i caratteri grossolani per cui ci è nota, le conferiscano la preziosa prerogativa dell'azione antitossica. Noi non abbiamo ricercato se le globuline attive del siero antidifterico si distinguessero da quelle del cavallo normale per caratteri fisici speciali (punto di coagulazione, potere rotatorio, solubilità ecc.) persuasi che, nell'incertezza che domina attualmente riguardo a tutti questi caratteri nel gruppo delle sostanze albuminose, poco di concreto avremmo potuto assodare.

---

(1) Vedasi p. es. « Encyclopedie Chimique di Fremy », tome IX, 2e section, 2e fasc.: « Chimie des liquides et des tissus de l'organisme » del Lambling, p. 111.

Possiamo dire soltanto che nei caratteri più grossolani la globulina antidifterica non si distingue per nulla dalla normale (1). Ad ogni modo se anche con ricerche più accurate si potesse accertare che la globulina attiva non si distingue cogli attuali mezzi d'indagine dalla normale, noi non ci crederemmo perciò autorizzati a ritenere che esse sieno chimicamente identiche, nè potremmo accettare le idee esposte recentemente da Behring al 15° Congresso di Medicina in Berlino. Dopo aver dichiarato vani tutti i tentativi diretti a preparare antitossine chimicamente pure, il Behring aggiunge: «.....es handelt sich gar nicht um eine chemische « Substanz, sonder um eine Kraft, die gar nicht hergestellt « werden kann. Wie das Eisen der Träger der magnetischen « Kraft, so sind die Eiweisskörper in Blut die Träger der anti- « toxischen Kraft ». Noi restiamo fermi al principio affermato tante volte dalla farmacologia e dalla chimica che ad ogni modificazione nell'azione fisiologica di una sostanza debba corrispondere una modificazione corrispondente nella struttura della sua molecola. Tale modificazione potrà essere piccola quanto si vuole, si potrà trattare di una sola ossidrile o di un sol gruppo metilico sostituito o spostato, ma certo ad una nuova proprietà delle albumine deve corrispondere un mutamento nell'architettura della molecola, perchè le azioni tossiche e antitossiche hanno tutti i caratteri di fenomeni chi-

(1) Allo scopo di verificare l'affermazione del Prof. Baldi, che le albumine del siero antidifterico sieno prive di zolfo, abbiamo fatto due analisi di questo elemento: 1° nelle albumine totali precipitate col calore e accuratamente lavate; gr. 1,454 di tali albumine essicate, a peso costante, ci diedero col metodo Liebig gr. 0,1342 di $BaSo^4$, ciò che corrisponde a 1,26 % di zolfo. 2° Precipitando il siero con 9 volumi di alcool, raccogliendo il precipitato dopo 1 mese, estraendolo con acqua distillata, filtrando e riprecipitando con alcool: gr. 0,6576 di tali albumine ci diedero col metodo di Liebig 0,0692 di $BaSO^4$, ossia 1,32 % di zolfo. Se accettiamo la percentuale di S risultante dalle analisi della globulina e della sieralbumina fatte da Hammarsten e se teniamo conto della proporzione in cui le due sostanze sono contenute nel siero, troviamo che la percentuale dello zolfo contenuta nell'albumina totale del siero è di 1,36 %, cifra assai prossima alle nostre.

mici, non di azioni puramente dinamiche. Ed è veramente strano che il Behring nella stessa comunicazione parli di neutralizzazione dei tossici da parte degli antitossici, a meno che per lui anche l'azione tossica non rappresenti soltanto una particolare forma di energia, non collegata a speciali aggruppamenti molecolari, ciò che sarebbe contraddetto dalle recenti scoperte di Brieger, che ci dimostrano esser l'azione antitossica dovuta a sostanze speciali da lui isolate.
